

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 58-144748

(43)Date of publication of application : 29.08.1983

(51)Int.CI. G01N 33/54

(21)Application number : 57-027594

(71)Applicant : EIKEN KAGAKU KK

(22)Date of filing : 23.02.1982

(72)Inventor : TSUBOTA NORIYUKI

OKA IMAO

KAKISHIMA HIROSHI

(54) LATEX REAGENT FOR IMMUNOLOGICAL REACTION

(57)Abstract:

PURPOSE: To improve the preservative stability and the measuring sensitivity of a latex reagent by adding polypeptide to a suspension of latex particles to which an antigen or an antibody is sensitized at a specified rate per 100pts by volume.

CONSTITUTION: In a latex reagent for immunological reaction, polypeptide is added to a suspension of latex particles to which an antigen or an antibody is sensitized at a rate of 0.5W8.0pts. per 100pts by volume. The polypeptide herein used is 1,000W10,000 in the molecular weight, preferably 1,000W5,000 as desired. Such a polypeptide can be obtained, for example, by hydrolysis of gelatin, ovoalubmin, lactalubmin, serum albumin of an animal or the like by means of a protein decomposing enzyme, an acid or the like and refining the product by a proper means.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

保存時の安定性が他の粗体よりも優れ、抗原、抗体等の蛋白質を強く吸着し、さらにこうして結合した抗原、抗体の性質を変化なく保持しうる点でも使われているため多くの免疫反応試験に用いられ、特に凝集反応試験の粗体として使用されている。

しかしながら、合成ラテックスにおいても、その保存中に自然凝集を起すことがある。この問題を防止するため、従来感作したラテックスの懸濁液にウシ血清アルブミン、ウマ血清アルブミン等のアルブミンを添加して、ラテックス粒子の表面荷電を負に維持することにより上記自然凝集を防止した免疫学的反応用ラテックス試験が主として使用されていた。しかしながら、このようなアルブミン添加によつても長期間の保存においては感作ラテックスの自然凝集を阻止することは不可能であつた。したがつて自然凝集を発生することなく、長期間保存しうる免疫学的反応用ラテックス試験（以下、単にラテックス試験という）の開発が強く要望されてい

クス試験において、抗原または抗体を感作したラテックス粒子の懸濁液 100 容量部当り 0.5 ~ 8.0 重量部の割合でポリペプチドを添加したことを特徴とする安定化された免疫学的反応用ラテックス試験を提供するものである。

本発明で用いられるポリペプチドは、分子量 1,000 ~ 10,000、好ましくは分子量 3,000 ~ 5,000 の仕事のポリペプチドである。このようなポリペプチドは、例えはゼラチン、オボアルブミン、ラクトアルブミン、動物の血清アルブミン等を蛋白質分離試験、等、その他の適当な手段により加水分解し、適当な手段で精製して得ることができる。

ポリペプチドの分子量は、10,000 より大きいときは従来の長期間保存時のラテックス試験の非特異性凝集の問題が解消されず、1,000 より小さいときは、添加による効果が十分得られないので 1,000 ~ 10,000 の範囲でなければならぬ。

ポリペプチドの添加は、感作ラテックスを任

た。

このような状況に鑑み、本発明者等は観察研究の結果、感作したラテックスの表面を従来のようにアルブミンの添加により被覆しようとしても、アルブミンの分子量が大きいためにラテックス粒子表面を密に被覆して該表面の荷電を不活性化することができず、これが長期間保存したときの自然凝集の阻止を不可能にする原因であることが見出した。さらに、アルブミンは分子量が大きいため、ラテックスに感作した抗原あるいは抗体に対しても立体障害を及ぼして、抗原抗体反応を阻害し、試験の測定感度を低下させることも見出した。

本発明者等は以上の知見に基づき、アルブミンの代りに分子量の小さいポリペプチドを感作ラテックスに添加することにより、ラテックス試験の保存安定性および測定感度が従来に比べて大巾に改善されることを見出し、本発明を完成した。

したがつて、本発明は免疫学的反応用ラテ

クス試験において、抗原または抗体を感作したラテックス粒子の懸濁液 100 容量部当り 0.5 ~ 8.0 重量部の割合でポリペプチドを 0.5 ~ 8 重量部添加することにより行なう。0.5 重量部より少ないとポリペプチドの添加によるラテックス試験の安定化が十分でなく、8 重量部より多いと感作ラテックス試験の測定感度が低下するのでポリペプチドは 0.5 ~ 8 重量部で添加する。

本発明のラテックス試験は懸濁液状態で長期間安定に保存しうるが、凍結乾燥状態で保存することもできる。

次に実施例により本発明をさらに詳しく説明する。

実施例 1 ▲

試験の調製

- (1) 5 %/v/v ポリスチレンラテックス液 0.1 M プリシン食塩緩衝液 (pH 8.2) に 5 %/v/v になるようにポリスチレンラテックスを浮遊させる。

- (2) 1 %/v/v 抗ヒト胎盤性ゴナドトロビンウサ

牛血清アーグロブリン溶液

抗ヒト胎盤性ゴナドトロビンウサギ血清のアーグロブリン分画を0.1%グリシン緩衝液(出8.2)に1.0%となるように希釈する。

(3) 抗ヒト胎盤性ゴナドトロビンウサギアーグロブリン感作ラテックス試験

前記(1)の5.0%ボリスチレンラテックス溶液1容に前記(2)の抗ヒト胎盤性ゴナドトロビンウサギ血清アーグロブリン溶液4容を加え、37℃で1時間感作後、氷冷する。次いで遠心し、その沈渣をポリペプチド0.5~16.0%を含む0.1%グリシン緩衝液(出8.2)にて濃度0.5~1.0%となる感作ラテックス試験用溶液を調製する。

(4) ポリペプチドの調製

ゼラチン100.0gに精製水800mlを加え、塩酸にてpH1.8とした後ペブレン2gを加えた。これを37℃で24時間酵素分解した後、加熱処理し膜外透析器により分子量1000以上のものを濾過する。

調製した感作ラテックス試験用溶液に0.5%となるように添加し、この溶液を4℃に保存した。各保存期間毎にこの試験用溶液を用いて凝集反応によりヒト胎盤性ゴナドトロビンの測定を行なつたところ、表1に示すように区分2のポリペプチドを添加した本発明の試験は、従来のウシ血清アルブミンを安定剤として添加した試験に比べ、測定感度および保存安定性が明らかに優れていた。

表1

安定化剤 (濃度0.5%)	検出感度 (IU/ml)	保存安定性		
		6ヶ月	12ヶ月	24ヶ月
ウシ血清アルブミン (従来)	1.0	良	良	不良*
区分1 (本発明外)	1.0	良	不良*	
区分2(ポリペプチド) (本発明)	0.5	良	良	良

*不良とは凝集が出ないか出ても不鮮明であることを示す。

実施例1B

前記(3)で調製した抗ヒト胎盤性ゴナドトロビンウサギアーグロブリン感作ラテックス試験用

次にこの溶液を4×60mlのセファデックス-25カラムでグルアミン酸透析し、第1回に示すように、ポリペプチド付近に解出され高分子量の区分1およびそれ以外のポリペプチド区分2を別々に集めて濃縮後凍結乾燥し、区分2より得られたものをポリペプチドとする。

同様にラクトアルブミンあるいはオボアルブミン100.0gを0.8%炭酸ナトリウム溶液に溶解し出7.8にした後、パンクレアテン10gを加え37℃で72時間酵素分解する。

以下、ゼラチンの場合と同様に処理してポリペプチドを得る。

なお、本実施例においては蛋白分解酵素としてペブレンまたはパンクレアテンを使用したが、これらのみに限定されるものではない。

(5) ポリペプチドによる感作ラテックス試験の安定化

前記ゼラチンの酵素分解物よりグルアミン酸透析し得られた区分1および区分2を、前記(4)で

調製した感作ラテックス試験用溶液に0.5%となるように添加し、この溶液を4℃に保存した。各保存期間毎にこの試験用溶液を用いて凝集反応によりヒト胎盤性ゴナドトロビンの測定を行なつたところ、表2に示すように区分2のポリペプチドを添加した本発明の試験は、従来のウシ血清アルブミンを安定剤として添加した試験に比べ、測定感度および保存安定性が明らかに優れていた。

表2

添加物	ポリペプチド 最終濃度(g)	感度 (IU/ml)	保存安定性		
			6ヶ月	12ヶ月	24ヶ月
ゼラチン 酵素分解 ポリペプチド	0.1	0.5	良	良	良
	0.25	0.5	良	良	良
	0.5	0.5	良	良	良
	1.0	0.5	良	良	良
	2.0	0.5	良	良	良
	3.0	0.5	良	良	良
	4.0	0.5	良	良	良
	8.0	0.5	良	良	良
	16.0	1.5	良	良	良

表2に示した結果より、ポリペプチドの添加濃度は試験の感度の点からは8.0%以下であることが認められ、試験の保存安定性の点からは

0.5%以上であることが望ましい。この範囲の濃度でポリペプチドを添加した試験は、24ヶ月以上4℃に保存した後使用しても感度は何ら変化しない。

実験例2

試験の調製

(1) ホリスチレンラテックス液

実験例1 △(1)と同様にして調製する。

(2) 1%トキソプラズマ原虫液

トキソプラズマ原虫を0.1mgリシシン液稀釀(出B.2)に1%になるよう希釈する。

(3) トキソプラズマ原虫感作ラテックス試験

前記実験例1 △(3)の方法で抗ヒト胎盤性グリコナドトロビンウサギ血清ア-グロブリン液の代りに上記(2)のトキソプラズマ原虫液を用いて感作ラテックス試験稀釀液を調製する。

(4) ポリペプチド

実験例1 △(4)と同様の方法でラクトアルブミンから酵素加水分解により調製する。

(5) ポリペプチドによる感作ラテックス試験の変化
実験例1と同様にしてポリペプチド(ゲル伊過による区分2)を感作ラテックス試験に各濃度で添加し、この試験稀釀液を4℃に保存する。各保存期間後にこの試験を用いて感作反応によりトキソプラズマ原虫抗体の測定を行なったところ、表3に示すようにポリペプチドの添加濃度は試験の感度の点からは0.1%以下、試験の保存安定性の面からは0.5%以上であることが望ましい。この範囲の濃度でポリペプチドを添加した試験は、24ヶ月以上4℃に保存した後使用しても感度は何ら変化しない。

表3

添加物	ポリペプチド 最終濃度%	感度	保存安定性		
			6ヶ月	12ヶ月	24ヶ月
ラクトアルブミン	0.1	×128	不良	良	良
ラクトアルブミン	0.25	×128	不良	不良	良
ラクトアルブミン	0.5	×128	良	良	良
ラクトアルブミン	1.0	×128	良	良	良

ラクトアルブミン	2.0	×128	良	良	良
	3.0	×128	良	良	良
	4.0	×128	良	良	良
	8.0	×128	良	良	良
	16.0	×32	良	良	良

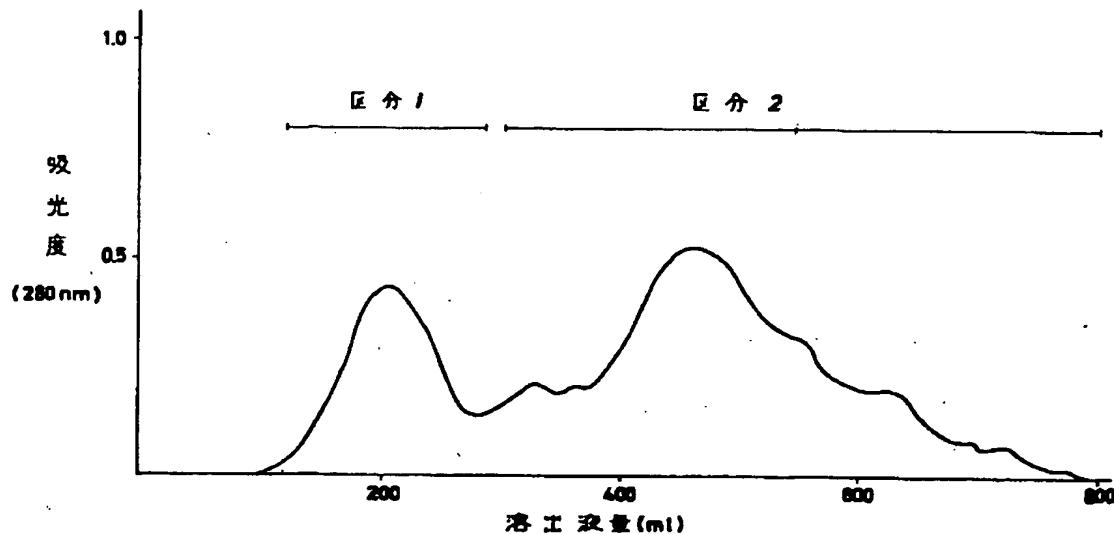
4. 図面の簡単な説明

図はポリペプチド調製時のセファデックスロ-25によるゲル伊過の分離状況を示す。

特許出願人 栄研化学株式会社
代理人弁理士 稲 勝 美

(ほか1名)





手 続 補 正 書

昭和 57 年 4 月 9 日

特許庁長官・審判長殿

1. 事件の表示 昭和 57 年 特許 第 27594 号

2. 発明の名称

免疫学的反応用ラテックス試薬

3. 補正する者

事件との関係 特許出願人

名称 株式会社

4. 代 理 人

住 所 東京都千代田区神田駿河台 1 の 6、主婦の友ビル

氏 名 (6271) 審 優 美

(ほか 1 名)



5. 補正命令の日付

昭和 57 年 4 月 9 日 「自発」

6. 補 正 の 対 象

明細書の発明の詳細を説明の欄

7. 補正の内容

(1) 明細書第 4 頁第 9 行の「あることが」を「あることを」と補正する。

(2) 同第 6 頁第 6 行の「ものである。」を「ものである。

本発明で用いられるラテックス粒子は、
好ましくは粒径 0.1 ~ 1.2 μ のものである。」
と補正する。(3) 同第 11 頁第 9 行、第 10 行、第 12 行、第 16 行
および第 18 頁第 8 行の「原虫」を「抗原」と
補正する。